



**Europäisches
Patentamt**

**Eur pean
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

01105960.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 11/01/02
LA HAYE, LE



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 01105960.7

Anmeldetag:
Date of filing: 09/03/01
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
1800 Vevey
SWITZERLAND

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Huile contenant un ou des acide(s) gras polyinsaturé(s) à longue chaîne issus de biomasse, procédé
de Préparation, aliment, composition nutritionnelle, cosmétique ou pharmaceutique la contenant

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

C11B1/10, C11B1/06, A23D9/00, C12P7/64, A23L1/30, A23C11/04, A23K1/16, A61K7/48

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Huile contenant un ou des acides gras polyinsaturé(s) à longue chaîne issus de biomasse, procédé de préparation, aliment, composition nutritionnelle, cosmétique ou pharmaceutique la contenant

5

Introduction

La présente invention a trait au domaine de la préparation d'une huile servant d'ingrédient source d'acides gras essentiels polyinsaturés à longue chaîne (LC-PUFA) dans un aliment, dans un supplément nutritionnel, dans une composition cosmétique ou pharmaceutique.

10

Etat de la technique

15

Une huile contenant des LC-PUFA comme par exemple les acides arachidonique (ARA), docosahexaénoïque (DHA) ou dihomogammalinolénique (DHGLA) peut être obtenue à partir d'un bouillon de fermentation d'une biomasse. Pour obtenir l'huile de la biomasse on a utilisé des méthodes d'extraction par solvant organique, par exemple l'hexane ou par fluide supercritique. Généralement, l'huile a été extraite à partir de biomasse par percolation à l'hexane de la biomasse séchée.

20

Un tel procédé d'extraction par solvant(s) organique(s) est décrit par exemple dans WO9737032, dans WO 9743362 ou dans la publication Journal of Dispersion Science and Technology, 10, 561-579, 1989 "Biotechnological processes for the production of PUFAs".

25

Cette technique présente différents inconvénients:

30

- Lors des étapes d'extraction par solvant chaud et de distillation du solvant les LC-PUFA peuvent subir une dégradation au contact de l'oxygène.
- L'élimination totale du solvant contenu dans l'huile ou dans la biomasse résiduel exige un traitement thermique à température élevée.
- Par ailleurs, le solvant, tel que l'hexane est susceptible de dissoudre des constituants non-triacylglycérols de la biomasse qui constituent en fait des impuretés.

35

5 L'huile brute obtenue après évaporation du solvant doit encore subir plusieurs étapes de raffinage comprenant un dégomme, une neutralisation à l'alcali, une décoloration, un décirage et une désodorisation dans le but d'éliminer au moins partiellement les impuretés. Cela implique que l'huile très insaturée est exposée à des conditions stimulant des réactions physico-chimiques qui affectent sa qualité. Par exemple, les agents de décoloration créent un système de doubles liaisons conjuguées et forment des produits de dégradation par réaction chimique avec les glycérides oxydés.

10 La présente invention a pour but d'éviter les inconvénients de l'art antérieur, en proposant une huile stable contenant un ou des acides gras polyinsaturés issus de biomasse sous forme de triacylglycérols à l'état purifié et ayant subi un minimum de dégradation.

Résumé de l'invention

15 La présente invention concerne une huile stable contenant des LC-PUFA sous forme de triacylglycérols, notamment les acides arachidonique (ARA), dihomogammalinolénique (DHGLA), docosahexaénoïque (DHA), ou eicosapentaénoïque (EPA).

20 L'invention concerne également un procédé de préparation d'une telle huile par mise en contact d'une huile support entrant dans la composition d'un aliment avec une biomasse provenant de la culture d'un microorganisme, notamment d'un champignon ou d'une microalgue contenant les acides ARA, DHGLA, DHA ou EPA.

25 De préférence, l'huile ne contient pas plus de 10 % en poids d'acides gras polyinsaturés. De ce fait, l'huile est beaucoup moins sensible à l'oxydation lors de sa production ce qui n'est pas le cas pour les huiles contenant des LC-PUFA de l'art antérieur.

30 Selon un aspect principal de l'invention, c'est un avantage qualitatif déterminant de disposer d'une huile nouvelle, contenant des LC-PUFA sous forme de triacylglycérols.

35

Selon un autre aspect, l'invention concerne un aliment, un produit cosmétique ou pharmaceutique, un supplément nutritionnel ou un aliment pour animaux contenant l'huile précédente.

- 5 Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un aliment pour animaux, en particulier pour animaux familiers contenant le résidu de biomasse issu du procédé.

Description détaillée de l'invention

10

La transformation est réalisée par mise en contact de l'huile support avec une biomasse contenant des LC-PUFA. L'huile est adaptée à l'application dans les aliments, en particulier les formules infantiles ou à l'utilisation comme supplément nutritionnel. Elle peut également être utilisée dans des produits cosmétiques ou pharmaceutiques. De plus, le résidu de biomasse obtenu est également un produit du procédé qui peut être valorisé directement sans traitement ultérieur, par exemple comme aliment pour animaux, en particulier pour animaux familiers.

15

La préparation d'une telle huile peut avoir lieu par simple mélange de l'huile support avec la biomasse séchée et séparation ultérieure de l'huile d'avec les solides non lipidiques par pressage.

20

En vue d'augmenter le rendement en LC-PUFA obtenu, il est préférable de réduire les dimensions des particules de biomasse sèche pour briser les parois des cellules de microorganismes et augmenter ainsi la surface de contact entre l'huile et la biomasse. Cela peut être réalisé de manière appropriée par utilisation de différentes méthodes, par exemple:

25

- on peut broyer la biomasse en présence de l'huile support ;
- on peut laminer la biomasse avant de la mélanger avec l'huile support;
- 30 - on peut traiter la biomasse sous haute pression en présence de l'huile support ; puis séparer l'huile obtenue d'avec la biomasse par pressage et filtration de finition.
- on peut traiter la biomasse avec des enzymes capables de dégrader les parois des cellules.

35

- 5 Du fait que le support est une huile, l'huile obtenue après contact avec la biomasse a un contenu minimum en phospholipides, acides gras libres, pigments, polymères et autres substances issues ou dérivées de la biomasse qui ne sont pas des triacylglycérols. Cela signifie que le procédé selon l'invention constitue une méthode sélective de préparation d'une huile purifiée stable contenant des LC-PUFA. Il n'est pas nécessaire de purifier l'huile insaturée contenant les LC-PUFA par les méthodes agressives et lourdes utilisées antérieurement à l'invention que sont les étapes de dégomme, neutralisation, décoloration et décoloration.
- 10 Selon l'invention, l'huile est soumise uniquement à une étape de désodorisation, par exemple par entraînement à la vapeur ou distillation moléculaire à température relativement basse. Il en résulte que l'huile contient une quantité particulièrement faible d'acides gras trans.
- 15 Le procédé n'utilise pas de solvant organique et, dans la mesure où l'on travaille sous couche d'azote et en présence de tocophérols naturellement présents ou rajoutés dans l'huile support, les LC-PUFA sont protégés de la dégradation oxydative pendant tout le procédé.
- 20 En plus de la qualité de l'huile obtenue, un autre avantage du procédé consiste dans le fait que le résidu de biomasse n'est pas contaminé par un solvant organique et peut ainsi être valorisé directement, sans traitement ultérieur, par exemple dans des aliments pour animaux, notamment pour animaux familiers.
- 25 La description détaillée du procédé qui suit est ciblée sur la préparation d'une huile contenant l'ARA, pris à titre d'exemple, non limitatif. Les conditions de travail pour transférer d'autres LC-PUFA vers une huile support à partir des biomasses appropriées, par exemple pour le DHA ou le DHGLA sont très proches.
- 30 L'huile est obtenue par mélange de l'huile support avec la biomasse sèche et séparation de l'huile d'avec les composants solides par pressage. Pour augmenter le taux d'incorporation en ARA, il est souhaitable de rompre les cellules microbiennes par des traitements sous haute pression, par des procédés enzymatiques ou de réduire les dimensions des particules sèches de biomasse par
- 35 mouture ou laminage.

L'étape de mouture mise en oeuvre peut être l'une des nombreuses techniques connues de l'art antérieur. Par exemple, on peut laminer la biomasse, de préférence à basse température, puis on peut la mélanger avec l'huile support. En variante, on peut moudre la biomasse en présence de l'huile support. En vue de minimiser
5 autant que possible la détérioration de l'ARA, les conditions de mouture doivent être douces. Dans cette optique, on préfère moudre la biomasse en présence de l'huile support et sous atmosphère inerte, par exemple sous balayage d'azote.

10 Ensuite, on sépare l'huile contenant l'ARA d'avec la biomasse par filtration ou pressage, de préférence sous forte pression, puis on effectue une filtration de finition de manière à éliminer les particules fines de biomasse.

15 On a constaté que le taux d'incorporation en ARA augmentait lorsque la taille des particules de biomasse diminuait, celui-ci était > 90% lorsque par exemple 90% des particules avaient une dimension < 250 µm.

20 A titre d'exemple, on peut utiliser un moulin à billes ou un moulin colloïdal. Les paramètres à considérer sont la durée de mouture, la taille des particules de biomasse, la température de mouture, le rapport entre les quantités de biomasse et d'huile support.

25 La durée de mouture a une influence sur la taille des particules et cette dernière est également influencée par la température de mouture. Par suite, en pratique, on préfère indiquer la taille des particules comme paramètre déterminant de l'étape de mouture. Ainsi, il est souhaitable que 90 % des particules soient de dimension < 500 µm, de préférence que 90 % des particules soient de dimension < 300 µm et de manière encore plus préférée que 90 % des particules soient de dimension < 200 µm.

30 La température de mouture est choisie à une valeur supérieure au point de fusion de l'huile support, et est de préférence de 20 à 80° C. Pour obtenir un taux d'incorporation optimal, on peut effectuer une mouture brève à température élevée ou une mouture prolongée à basse température.

35 Le rapport pondéral choisi entre la biomasse et l'huile support détermine le contenu en ARA de l'huile finale. Ainsi, par exemple, on choisit 30 parties de

biomasse pour 70 parties d'huile support pour obtenir au moins 4,5 % d'ARA dans l'huile transformée.

5 L'huile utilisée comme support peut être n'importe quelle huile ou mélange d'huiles consommable en alimentation humaine. On utilise de préférence une huile ou un mélange entrant dans la composition du produit que l'on souhaite enrichir en PUFA. On peut citer en particulier pour une formule infantile l'huile de tournesol riche en acide oléique (HOSFO), l'huile de tournesol (SFO), l'huile de soja, l'oléine de palme et un triacylglycérol à chaîne moyenne (MCT, contenant
10 essentiellement des triacylglycérols d'acides gras saturés en C₈-C₁₀).

L'étape suivante du procédé consiste à séparer le résidu de biomasse épuisée par toute méthode usuelle comme par exemple le pressage, la filtration ou la centrifugation. A cet effet on utilise de préférence une presse opérant sous forte
15 pression.

L'huile obtenue doit être débarrassée des particules fines insolubles par filtration fine. Cette opération peut être effectuée le cas échéant en mettant l'huile en présence d'un adsorbant minéral en qualité d'aide à la filtration, par exemple la
20 dicalite.

Enfin, l'huile filtrée est désodorisée pour en éliminer les substances volatiles. Cela peut être réalisé par toute méthode connue pourvu que cela soit dans des conditions modérées de manière à ménager l'ARA. On peut citer, par exemple,
25 l'entraînement à la vapeur, de préférence sous vide ou la distillation moléculaire.

L'huile obtenue peut être utilisée dans des compositions alimentaires pour l'alimentation humaine telle quelle ou sous forme d'émulsion comme par exemple les huiles, sauces pour salade ou mayonnaises. Elle peut être un constituant d'un
30 lait diététique pour adolescents ou adultes, d'une formule infantile pour prématurés, nourrissons nés à terme ou un lait de suite pour petits enfants.

Elle peut être incorporée dans une composition nutritive ou de supplémentation, pour l'alimentation orale.
35

Elle peut être incorporée dans une composition pharmaceutique pour l'ingestion orale, entérale ou parentérale, ou pour l'application topique dermatologique ou ophtalmique.

- 5 Elle peut constituer un ingrédient d'une composition cosmétique, topique ou orale.

Enfin, elle peut constituer un ingrédient d'un aliment pour animaux familiers, par exemple un aliment sec, humide ou un lait.

- 10 Le résidu de biomasse après séparation de l'huile peut avantageusement être utilisé dans les aliments pour animaux, particulièrement les animaux familiers.

Exemples

- 15 Les exemples ci-après illustrent l'invention. Dans ceux-ci, les parties et pourcentages sont pondéraux, sauf indication contraire.
Le rapport biomasse:huile support est de 3:7.

Exemples 1-6

20

Dans ces exemples, on étudie les paramètres du procédé et la qualité de l'huile obtenue, avant l'étape finale de désodorisation, en comparaison avec l'huile support de départ (référence 1). Pour la mouture, on utilise un moulin à billes. Les résultats sont résumés dans le tableau 1 ci-après:

Tableau 1

Exemple	1	2	3	4	5	6	Référence 1
Température de mouture (°C)	50	70	50	30	70	30	Huile support *
Durée de mouture (min)	3	5	3	5	1	1	-
Acides gras libres (%) IUPAC 2.201	0,13	0,13	0,14	0,12	0,17	0,15	0,14
Indice de peroxide (meq/kg) AOCS Cd 8b-90	4,0	4,1	3,5	3,5	4,0	3,4	2,7
Insaponifiables (g/kg) IUPAC 2.401	8,34	9,20	8,82	8,03	8,11	7,44	6,78
ARA (g ARA/100g huile) IUPAC 2.304	4,4	4,87	4,25	4,46	3,81	3,27	0
Phosphore (ppm) NI C12-1976-SSOG	2	1	3	2	2	4	6

* L'huile support est une huile de tournesol riche en acide oléique, TRISUN™.

La valeur théorique d'incorporation de 100 % d'ARA est 5,3 % avec un rapport biomasse:huile support de 3:7.

10 La pureté de l'huile brute peut être qualifiée par les valeurs ci-après:

- Acides gras libres: 0,13-0,17 % (TRISUN, huile support: 0,14 %)
- Phosphore: 1-4 ppm (partie par million) (TRISUN: 6 ppm)
- Matière insaponifiable: 7,4-9,2 g/kg (TRISUN: 6,8 g/kg)

15 En conclusion:

- Plus de 60 % de l'ARA de la biomasse est incorporé dans l'huile support.
- Le contenu en phosphore est très bas, quelques ppm, environ 100 x moins que dans le cas de l'huile brute extraite à l'hexane qui était d'environ 500 ppm.

Exemples 7-10

- 5 Dans ces exemples, on étudie les paramètres du procédé et la qualité de l'huile obtenue, après l'étape finale de désodorisation, lors d'utilisation de différentes huiles supports. Dans ces exemples, la mouture de la biomasse se fait à l'aide d'un moulin à billes.
- 10 On compare les caractéristiques des huiles obtenues, en comparaison avec l'huile brute obtenue par extraction à l'hexane, sans raffinage (référence 2) et en comparaison avec l'huile obtenue par pressage direct, donc sans huile support (référence 3).

Les résultats sont résumés dans le tableau 2 ci-après:

Tableau 2

Exemple	7	8	9	10	Référence 2	Référence 3
Huile support	HOSFO*	HOSFO*	MCT	Oléine de palme		
Conditions de mouture: température (° C), Durée (min)	70 5	30 10	70 5	70 5		
Acides gras libres (%)	0,04	0,03	0,04	0,04	0,56	0,11
Indice de peroxyde (meq/kg)	2,0	2,3	2,3	1,3	11,5	4,8
Matière insaponifiable (g/kg)	8,02	7,05	3,53	5,40	22,89	17,59
Phosphore (ppm)	3	4	4	3	508	17
ARA (g ARA/100g huile)	4,6	4,7	4,5	4,4	39,5	39,6

5 *L'huile support est une huile de tournesol riche en acide oléique (HOSFO).

Les résultats obtenus permettent les conclusions suivantes:

- La température et la durée de mouture sont couplées: une mouture de 10 min à 30 °C donne le même taux d'incorporation en ARA qu'une mouture pendant 5 min à 70 °C
- Le taux d'incorporation dépend seulement légèrement du type d'huile support lorsque l'on opère à la même température/durée de mouture: huile de

tournesol riche en acide oléique (4,9 % ARA à 70 °C/5min), MCT (5,0 % ARA à

70 °C/5min) et oléine de palme (5,0 % ARA à 70 °C/5min).

- On obtient une très faible quantité de phosphore par rapport à celle obtenue par extraction à l'hexane, ce qui montre la pureté de l'huile finale.

Exemples 11-14

Les exemples ci-après montrent la préparation d'une huile contenant l'ARA sous forme de triacylglycérols par un procédé ménageant la qualité de l'ARA en utilisant plusieurs voies, sans mouture (exemple 11) et avec différents équipements de mouture (exemples 12-14).

Matières utilisées:

Biomasse contenant 36,3 % d'huile à 39,5 % d'acide arachidonique (ARA).

Huile de tournesol riche en acide oléique.

Oléine de palme.

Huile MCT.

Exemple 11- Préparation par contactage avec de l'huile de tournesol riche en acide oléique.

Equipement:

Réacteur agité en verre de 1000 ml avec double-manteau, relié à un bain thermostaté.

Presse Carver avec cartouche filtrante 48 x 200 mm.

Filtre-cloche thermostaté MAVAG 300 ml.

Désodoriseur de laboratoire selon J.HEIDE-JENSEN (JAOCS; Vol. 40; 223-224; 1963) avec ballon de 1000 ml.

Procédure:

On introduit 260 g d'huile de tournesol riche en acide oléique et 112 g de biomasse dans le réacteur. On met le récipient sous vide et on remplace l'air par de l'azote à trois reprises pour l'inertisation. On agite ensuite le réacteur à 50 °C pendant 2 h, puis on récupère le mélange dans une cartouche filtrante. On sépare

l'huile de la biomasse par pressage. On recueille 260 g d'huile et 110 g de tourteau.

On filtre l'huile pressée à 50 °C, puis on la désodorise à 180 °C, 1 mbar pendant 2,6 h. On obtient finalement 240 g d'une huile limpide d'odeur neutre et de coloration jaune-claire. On détermine la teneur en ARA de l'huile par l'analyse chromatographique en phase gazeuse (GC) et on calcule le taux d'incorporation de l'ARA.

Exemple 12.- Préparation par broyage avec de l'oléine de palme dans un broyeur à billes.

Equipement:

Broyeur à billes DYNO-MILL Type KDL avec récipient de broyage 0,3 l, double-manteau relié à un bain thermostaté.

Presse Carver avec cartouche filtrante 48 x 200 mm.

Filtre-cloche thermostaté MAVAG 300 ml.

Désodoriseur de laboratoire selon J.HEIDE-JENSEN (JAOCS; Vol. 40; 223-224; 1963) avec ballon de 1000 ml.

Procédure:

On introduit 130 g d'oléine de palme et 56 g de biomasse dans le récipient du broyeur. On met le récipient sous vide et on remplace l'air par de l'azote à trois reprises pour l'inertisation. On ajoute 220 ml de billes de verre d'un diamètre de 2 mm et on chauffe le récipient à 65 °C à l'aide du bain thermostaté. On broie ensuite le mélange pendant 5 min à une température de 65 à 75 °C, puis on vidange le récipient. On sépare les billes du mélange par filtration sur une grille d'un diamètre de 1 mm, on récupère le mélange dans une cartouche filtrante et on prélève un échantillon pour la mesure de la taille des particules. On sépare l'huile de la biomasse par pressage. On répète la procédure une deuxième fois.

On recueille 225 g d'huile et 75 g de tourteau. On filtre l'huile pressée à 50 °C, puis on la désodorise à 180 °C, 1 mbar pendant 2,2 h. On obtient finalement 210 g d'une huile limpide d'odeur neutre et de coloration jaune-claire. On détermine la teneur en ARA de l'huile par l'analyse GC et on calcule le taux d'incorporation de l'ARA.

Exemple 13- Préparation par broyage avec de l'huile MCT dans un broyeur à billes.

5 On répète l'essai décrit dans l'exemple 12 en utilisant de l'huile MCT en remplacement de l'oléine de palme. On recueille finalement 235 g d'huile et 65 g de tourteau.

10 On filtre l'huile pressée à 50 °C, puis on la désodorise à 180 °C, 1 mbar pendant 2,3 h. On obtient finalement 220 g d'une huile limpide d'odeur neutre et de coloration jaune-claire. On détermine la teneur en ARA de l'huile par l'analyse GC et on calcule le taux d'incorporation de l'ARA.

Exemple 14- Préparation par broyage avec de l'huile de tournesol riche en acide oléique dans un broyeur colloïdal.

15

Equipement:

Broyeur colloïdal FRYMA MZ 80.

Centrifugeuse à panier PADBERG.

Filtre-cloche thermostaté MAVAG 300 ml.

20

Désodoriseur de laboratoire selon J. HEIDE-JENSEN (JAOCS; Vol. 40; 223-224; 1963) avec ballon de 1000 ml.

Procédure:

25 On introduit 2800 g d'huile de tournesol riche en acide oléique et 1200 g de biomasse dans le récipient du broyeur. Le broyage s'effectue par recirculation du mélange dans le broyeur sous atmosphère inerte pendant 10 minutes à une température de 40 à 70 °C. On récupère le mélange et on prélève un échantillon pour la mesure de la taille des particules. On sépare l'huile de la biomasse à l'aide de la centrifugeuse à panier. On recueille finalement 2400 g d'huile et 1400 g de tourteau.

30

35 On filtre 200 g de l'huile centrifugée à 50°C, puis on la désodorise à 180°C, 1 millibar pendant 2 heures. On obtient finalement 190 g d'une huile limpide d'odeur neutre et de coloration jaune-claire. On détermine la teneur en ARA de l'huile par l'analyse GC et on calcule le taux d'incorporation de l'ARA. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3 ci-après:

Tableau 3

Exemple	Taille des particules (Malvern Mastersizer) micron D (v, 0,9)*	g ARA dans 100 g huile	% taux d'incorporation de l'ARA
11	3000	3,5	66,1
12	75	5,0	94,3
13	60	5,0	94,3
14	115	5,25	99,0

- 5 *Micron, D (v, 0,9): signifie que 90 % en volume des particules ont un diamètre inférieur à D.

Exemple 15: Incorporation de DHA dans l'huile de tournesol riche en acide oléique

10

Equipement:

Broyeur colloïdal FRYMA MZ 80.

Centrifugeuse à panier PADBERG.

Filtre-cloche thermostaté MAVAG 300 ml.

- 15 Désodoriseur de laboratoire selon J.HEIDE-JENSEN (JAOCS; Vol. 40; 223-224; 1963) avec ballon de 1000 ml.

Procédure:

- 20 On répète la procédure de l'exemple 14 en traitant 1200 g d'une biomasse contenant 25 % d'une huile avec une teneur en DHA de 40 %. On recueille 2500 g d'huile avec une teneur en DHA de 3,5 % que l'on désodorise.

Exemples 16-21

- 25 16-17. On prépare une formule infantile pour prématurés enrichie en ARA à partir de l'huile préparée par le procédé des exemples 12 ou 13 et on y ajoute d'autres huiles par exemple dans les proportions indiquées dans le tableau 4 ci-dessous, des protéines, le cas échéant hydrolysées, des hydrates de carbone et le cas échéant des vitamines et des oligoéléments.

Tableau 4

	Exemple 16	Exemple 17
Huile de l'exemple 12	4	-
Huile de l'exemple 13	-	4
Huile de poisson	1,5	1,5
Huile MCT	27	25
Huile de soja	23	23
Oléine de palme	44,5	35
Huile de tournesol riche en acide oléique	-	11,5
Total	100	100

5 18-19. On prépare une formule infantile pour nourrissons nés à terme enrichie en ARA à partir de l'huile support préparée par le procédé des exemples 13 ou 14 et on y ajoute d'autres huiles par exemple dans les proportions indiquées dans le tableau 5 ci-dessous, des protéines, le cas échéant hydrolysées, des

10

Tableau 5

	Exemple 18	Exemple 19
Huile de l'exemple 13	4,5	-
Huile de l'exemple 14	-	7
Huile de poisson	1,5	1,5
Huile de coco	20	27,5
Huile de soja	20	20
Oléine de palme	54	44
Total	100	100

15

20-21. On prépare un lait de suite pour petits enfants enrichi en ARA à partir de l'huile support préparée par le procédé de l'exemple 12 ou enrichi en DHA à partir de l'huile support préparée par le procédé de l'exemple 15, et on y ajoute d'autres huiles dans les proportions indiquées dans le tableau 6 ci-

dessous, des protéines, le cas échéant hydrolysées, des hydrates de carbone et le cas échéant des vitamines et des oligoéléments.

Tableau 6

	Exemple 20	Exemple 21
Huile de l'exemple 12	4	-
Huile de l'exemple 15	-	7
Huile de poisson	1,5	-
Huile de palmiste	27	-
Huile de coco	-	19
Huile de soja	23	-
Huile de colza	-	30
Oléine de palme	44,5	44
Total	100	100

5

Exemple 22

On prépare un lait liquide enrichi en DHA à raison de 1% de DHA dans la phase grasse de la manière suivante:

10 On pasteurise séparément un lait entier contenant 3,92 % de matière grasse et

8,58 % de solides non gras et un lait maigre contenant 0,05 % de matière grasse et 9 % de solides non gras, en les traitant à 87° C pendant 12 s.

15 On mélange ensuite 34,69 kg de lait entier et 160,26 kg de lait maigre, refroidi à 15° C, puis on incorpore à ce mélange un prémélange de 1,08 kg d'huile obtenue selon l'exemple 15 (huile de tournesol à haute teneur en acide oléique, contenant 3,5 % de DHA), 1,08 kg d'huile de soja et 1 g de vitamine E porté à 50° C au moyen d'un moulin colloïdal.

Produit stérilisé:

20 Après réchauffage à 80° C dans un échangeur à plaques, on stérilise le liquide par UHT à 148° C pendant 5 s. Après refroidissement à 78° C, on l'homogénéise en deux étages, à 200 bar, puis à 50 bar, on le refroidit à 20° C et on le conditionne aseptiquement dans des emballages de type brique ayant été préalablement

stérilisés, les étapes d'homogénéisation, de refroidissement et de remplissage ayant lieu de manière aseptique.

Produit pasteurisé:

- 5 On chauffe le liquide à 72° C pendant 15 s dans un échangeur à plaques, on l'homogénéise en deux étages à 200 bar, puis à 50 bar, on le refroidit à 4° C et on le conditionne dans des emballage de type brique.

Exemple 23

- 10 A titre de supplément nutritionnel, on encapsule une huile préparée selon l'exemple 12, 13 ou 14 contenant l'ARA ou une huile préparée selon l'exemple 15, contenant le DHA à raison de 500 mg d'huile dans des gélules.

15

Revendications

1. Huile stable entrant dans la composition d'un produit alimentaire,
5 nutritionnel, pharmaceutique ou cosmétique destiné à l'usage humain ou animal, contenant un ou plusieurs acides gras polyinsaturés à longue chaîne provenant d'une biomasse, sous forme de triacylglycérols servant à la fois de milieu de transfert des dits acides gras polyinsaturés à longue chaîne à partir de la biomasse et de support des dits acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans le dit produit
10 alimentaire, nutritionnel, pharmaceutique ou cosmétique et dans laquelle les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont incorporés de telle manière que, au moins 60 % en poids des acides gras polyinsaturés à longue chaîne présent dans la biomasse se retrouve dans l'huile et que moins de 10 % du phosphore présent dans la biomasse se retrouve dans l'huile.
- 15 2 Huile selon la revendication 1, dans laquelle les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont choisis parmi l'acide arachidonique, l'acide dihomogammalinolénique, l'acide eicosapentaénoïque ou l'acide docosahexaénoïque.
- 20 3 Huile selon la revendication 2, dans laquelle l'acide gras polyinsaturé à longue chaîne est l'acide arachidonique.
- 25 4. Huile selon la revendication 2, dans laquelle l'acide gras polyinsaturé à longue chaîne est l'acide docosahexaénoïque.
- 30 5. Procédé de préparation d'une huile selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel on met en contact une huile support, entrant dans la composition d'un produit alimentaire, nutritionnel, pharmaceutique ou cosmétique, avec une biomasse provenant de la culture d'un microorganisme contenant un ou des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, de manière à transférer le ou les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sous forme de triacylglycérols vers le dit support, on sépare l'huile contenant le ou les dits acides gras du résidu de biomasse par pressage et filtration et on la désodorise dans des conditions ménageantes.
- 35

- 5 6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on réduit les dimensions des particules de biomasse sèche pour briser les parois des cellules de microorganismes et augmenter ainsi la surface de contact entre l'huile et la biomasse, en la broyant avant de la mélanger avec l'huile support.
- 10 7. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on traite la biomasse sous forte pression en présence de l'huile support, puis on sépare l'huile obtenue contenant l'acide gras polyinsaturé à longue chaîne d'avec la biomasse par pressage et filtration.
- 15 8. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on soumet la biomasse à une mouture en présence de l'huile support dans des conditions douces, à température modérée sous atmosphère inerte, notamment sous couche d'azote.
- 20 9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, dans lequel on effectue une filtration de finition de manière à éliminer les particules fines de biomasse.
- 25 10. Aliment contenant une huile selon l'une des revendications 1 à 4.
- 30 11. Aliment infantile contenant une huile selon l'une des revendications 1 à 4.
12. Composition nutritionnelle contenant une huile selon l'une des revendications 1 à 4.
- 35 13. Composition cosmétique sous forme sèche ou d'émulsion contenant une huile selon l'une des revendications 1 à 4.
14. Aliment contenant une huile selon l'une des revendications 1 à 4 destiné à l'alimentation des animaux .
15. Aliment contenant le résidu de la biomasse obtenu par le procédé selon l'une des revendications 5 à 8 destiné à l'alimentation des animaux.

Huile contenant un ou des acides gras polyinsaturé(s) à longue chaîne issus de biomasse, procédé de préparation, aliment, composition nutritionnelle, cosmétique ou pharmaceutique la contenant

5 Abrégé

Huile stable contenant des LC-PUFA sous forme de triacylglycérols, notamment les acides arachidonique (ARA), dihomogammalinolénique (DHGLA), docosahexaénoïque (DHA), ou eicosapentaénoïque (EPA).

10

Une telle huile peut être préparée par mise en contact d'une huile support entrant dans la composition d'un aliment, d'un produit cosmétique ou pharmaceutique, avec une biomasse provenant de la culture d'un microorganisme, notamment d'un champignon ou d'une microalgue contenant les acides ARA, DHGLA, DHA ou EPA.

15

20